

24729

(19) 日本国特許庁 (JP) (11) 特許出願公開
(2) 公開特許公報 (A) 昭63-317079

(5) Int. Cl. C 12 N 9/02 // C 12 N 15/00 (C 12 N 9/02 C 12 R 1:865)	識別記号 厅内整理番号 7823-4B A-8412-4B	(4) 公開 昭和63年(1988)12月26日 審査請求 未請求 発明の数 1 (全11頁)
---	--	--

(3) 発明の名称 ルシフェラーゼの製造法

(2) 特願 昭62-151063

(2) 出願 昭62(1987)6月19日

(2) 発明者	増田 力	千葉県柏市明原2-9-16
(2) 発明者	辰巳 宏樹	千葉県野田市宮崎101-2
(2) 発明者	中嶋 康彦	千葉県野田市清水1071-89
(2) 発明者	松山 旭	千葉県野田市柳沢65-1
(2) 発明者	中野 衡一	埼玉県岩槻市木曾良2-86
①出願人	キッコーマン株式会社	千葉県野田市野田339番地
④代理人	弁理士 平木 祐輔	

明月系田

1. 発明の名称

ルシフェラーゼの製造法

2. 特許請求の範囲

- (1) ルシフェラーゼをコードする遺伝子をプラスミドベクター-DNAに挿入した組み換え体プラスミドDNAを含み、ルシフェラーゼ生産能を有するサッカロマイセス属に属する微生物を、培地に培養し、培養物よりルシフェラーゼを採取することを特徴とするルシフェラーゼの製造法。
- (2) ルシフェラーゼをコードする遺伝子が、フォティナス・ピラリス由来のDNAである特許請求の範囲第1項記載のルシフェラーゼの製造法。
- (3) プラスミドベクター-DNAが、プラスミドA A H S DNAである特許請求の範囲第1項記載のルシフェラーゼの製造法。
- (4) サッカロマイセス属の微生物が、サッカロマイセス・セレビシエである特許請求の範囲第1項記載のルシフェラーゼの製造法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、ルシフェラーゼの製造法に関し、さらに詳しくは、形質転換したサッカロマイセス属に属する微生物を使用したルシフェラーゼの製造法に関する。

(従来の技術)

従来、ホタルの1種であるフォティナス・ピラリス(*Photinus pyralis*)由来のルシフェラーゼは、例えば、微生物を用いて該ルシフェラーゼを製造する場合、プラスミド pKJ B 824.17DNAに、フォティナス・ピラリスのc-DNAを組み込んで得られた組み換え体プラスミド pKW101 DNAを用いて大腸菌(*E.coli*)TB1を形質転換して得られた形質転換株、すなわち、大腸菌(*E.coli*)TB1(pKW101)を培養して得られているに過ぎない(プロク・ナトル・アカド・サイ・(Proc.Natl.Acad.Sci.)、第82巻、第7870~7873頁、(1985))。上記ルシフェラーゼは、例えば、ATPの定量用酵素として極めて有用な酵素である。

(発明が解決しようとする問題点)

本発明は、上記ルシフェラーゼを、形質転換したサッカロマイセス属に属する微生物により製造する新規なルシフェラーゼの製造法を提供することを目的とする。

(問題点を解決するための手段)

本発明者等は上記目的を達成するため、フォティナス・ビラリス由来のルシフェラーゼを上記の大腸菌とは別に酵母サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)を宿主菌として用い、該ルシフェラーゼを発現すべく種々検討した結果、該ルシフェラーゼをサッカロマイセス・セレビシエの菌体中において効率良く発現させることに成功し、本発明を完成した。

すなわち本発明は、ルシフェラーゼをコードする遺伝子をプラスミドベクターDNAに挿入した組み換え体プラスミドDNAを含み、ルシフェラーゼ生産能を有するサッカロマイセス属に属する微生物を、培地に培養し、培養物よりルシフェラーゼを採取することを特徴とするルシフェラーゼ

例えば、免疫化学、山村雄一、第43~50頁(1973)記載の方法により得ることができる。

ルシフェラーゼをコードするm-RNAよりc-DNAを合成するには、例えば、モル・セル・バイオル(Mol.Cell Biol.)、第2巻、第161頁(1982)及びジーン(Gene)、第25巻、第263頁(1983)記載の方法により行なうことができる。

次いで、このようにして得られたc-DNAをベクターDNA、例えば、プラスミドpMCB10 DNA [プラスミドpKN305 (アグリ・バイオム・ケム(Agr.Biol.Chem.)、第50巻、第271頁(1986)記載の大腸菌トリプトファンオペロンのプロモーターを有するプラスミド)及びプラスミドpMC1843 (メソズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology)、第100巻、第293~308頁(1983)記載の大腸菌 β -ガラクトシダーゼ構造遺伝子を有するプラスミド)を用いて作製したプラスミド]等に組み込み、種々の組み換え体プラスミドDNAを得、該DNAを用いて例えば、大腸菌(E.coli)DH1 (ATCC33849)、大腸菌(E.coli)HB101

の製造法である。

以下、本発明を詳細に説明する。

先ず、ルシフェラーゼをコードする遺伝子の由来は、如何なるものでもよく、例えば、ホタルの1種であるフォティナス・ビラリス等が挙げられ、殊に、該ホタルの尾部が好ましい。

そして、上記ホタルの尾部よりm-RNAを調製するには、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)、第196頁、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ(Cold Spring Harbor Laboratory)(1982)及び分子遺伝学実験法、小間治男、志村令郎、第66~67頁(1983)記載の方法等により得ることができる。

得られたm-RNAよりルシフェラーゼをコードするm-RNAを濃縮するには、例えば、バイオメディカル・リサーチ(Biomedical Research)、第3巻、第534~540頁(1982)記載の方法により行なうことができる。

なお、この際、ルシフェラーゼに対する抗ルシフェラーゼ血清を使用するのであるが、該血清は、

(ATCC33694)等をコード(Cohen)等の方法(ジェイ・バクテリオル(J.Bacteriol.)、第119巻、第1072~1074頁(1974))により形質転換し、種々の形質転換株を得る。

なお、このようにして得られた形質転換株の有する組み換え体プラスミドDNAは、大腸菌 β -ガラクトシダーゼ構造遺伝子の途中にc-DNAが組み込まれたプラスミドであって、c-DNAによりコードされているペプチドは、 β -ガラクトシダーゼと融合した蛋白質として発現するものである。

上記の種々な形質転換株よりルシフェラーゼをコードするc-DNAを検出するには、形質転換株を培養することにより、菌体蛋白質を発現させ、抗ルシフェラーゼ血清と交差する蛋白質が存在するか否かにより検出することができ、例えば、アグリック・バイオム・ケム(Agric.Biol.Chem.)、第50巻、第271頁(1986)及びアナル・バイオケム(Anal.Biochem.)、第112巻、第195頁(1981)記載の方法等により行なうことができる。

特開昭63-317079(3)

次いで、不完全なルシフェラーゼのc-DNAを³²Pを用いニックトランスレーション法〔モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)、第109~112頁、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ(Cold Spring Harbor Laboratory)、(1982)及びジェイ・モル・バイオル(J. Mol. Biol.)、第113巻、第237~251頁(1977)によりラベルしたのち、該c-DNAをプローブとしてコロニーハイブリダイゼイション法〔蛋白質、核酸、酵素、第26巻、第575~579頁(1981)〕によりプラスミドpUC19DNAをベクターとして作成したc-DNAのジーンバンクのライブラリーより1.8Kbのルシフェラーゼをコードするc-DNAを含有するプラスミドDNAを得ることができる。

このようにして得たルシフェラーゼをコードするc-DNA含有プラスミドDNAを、制限酵素、例えばBamH I及びXba Iを温度30~40℃、好ましくは、37℃で1~24時間、好ましくは2時間作用させて、該プラスミドを切断したのに、翻訳開始部位を含むDNA断片(例えば、ATG含有

DNA等)及びT4DNAリガーゼ(宝酒造・社・製)等のDNAリガーゼを添加して常法により連結させて、組み換え体プラスミドDNAを得る。

次いで、該プラスミドに、例えば、Hind IIIを常法により作用させて、ルシフェラーゼをコードするc-DNAを含有するDNAを得、該DNAを、プラスミドベクターDNAに組み込み、組み換え体プラスミドDNAを得る。

上記プラスミドベクターDNAとしては如何なものでもよく、例えば、プラスミドAAH5DNA(ワシントン・リサーチ・ファウンデーションより入手)等が挙げられる。

そして、このようにして得られた組み換え体プラスミドを用いて、サッカロマイセス(Saccharomyces)属の酵母、例えば、サッカロマイセス・セレビシエSHY1(A T C C 44769)等を、ベッグス(Beggs)の方法〔ネーチュア(Nature)、第275巻、第104~109頁(1978)〕により形質転換してルシフェラーゼをコードする遺伝子をプラスミドベクターDNAに挿入した組み換え体プラスミド

DNAを含みルシフェラーゼ生産能を有するサッカロマイセス属に属する微生物を得る。

次いで、上記微生物を培地に培養し、培養物よりルシフェラーゼを採取するのである。

培地としては、例えば、サッカロマイセス属に属する微生物の培養に用いられるものであれば、如何なるものでもよく、例えば、グルコース、ポリペプトン、酵母エキスからなるYPD培地が挙げられる。

また、培養温度は、例えば、25~35℃、好ましくは30℃程度で、培養時間は、例えば、4~8時間、好ましくは6時間程度である。

そして、培養物より菌体を例えば、12,000r.p.m.で2分間程度の遠心分離処理により集菌し、得られた菌体を、例えば、ガラスピーズと共に、ボルテックスミキサーにより3分間程度攪拌して破砕し、粗酵素液を得る。

そして、粗酵素液は、そのままでも使用可能であるが、必要により硫酸分画、イオン交換クロマトグラフ法、例えば、DEAE-バイオゲルA等、

ゲル通過法、例えば、ウルトロゲルAcA34等により精製して、純化されたルシフェラーゼを得る。

このようにして得られたルシフェラーゼの理化学的性質は、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Molecular and Cellular Biology)、第7巻、第725~737頁(1987)に記載されたものと全く同様である。

(発明の効果)

本発明によれば、形質転換したサッカロマイセス属に属する微生物を使用して、ルシフェラーゼを効率よく製造することができるので、本発明は産業上極めて有用である。

以下、本発明を実施例を挙げて更に詳細に説明する。

実施例

1. m-RNAの調製

ホタルの1種であるフォティナス・ピラリス(Photinus pyralis)の乾燥尾部(シグマ・社・製)1gを乳鉢及び乳棒を用いて充分破碎したのに、溶解緩衝液5ml(20mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.4)

/10mM NaCl / 3 mM 酢酸マグネシウム / 5% (W/V) ショ糖 / 1.2% (V/V) ドリトンX-100 / 10mM バニジルヌクレオシド培体 (ニューイングランドバイオラボ・社・製) を添加し、更に、上記と同様に破碎してフォティナス・ピラリス尾部破碎物含有溶液を得た。

このようにして得た溶液 5 mL を、カップ型ブレンダー (日本精機製作所・社・製) に入れ、3,000 r.p.m. で 5 分間処理した後に、12 mL のグアニジンイソチオシアネット溶液 (6 M グアニジンイソチオシアネット / 37.5 mM クエン酸ナトリウム (pH 7.0) / 0.75% (W/V) N-ラウロイルザルコシンナトリウム / 0.15M β-メルカプトエタノール) を添加し、更に、上記ブレンダーを用い 3,000 r.p.m. で 10 分間処理して得た溶液を、3 重のガーゼを用いて滤過し、滤液を得、超遠心分離機用チューブ

(日立工機・社・製) 4 本に、予め 1.2 mL の 5.7 M の塩化セシウム溶液を夫々重層し、その上に、上記滤液を重層するように夫々分注し、超遠心分離機 (日立工機・社・製、SCP55H) を用いて

温度 15°C、30,000 r.p.m. で 16 時間遠心分離して沈澱物を得た。

得られた沈澱物を、冷 70% (V/V) エタノールを用いて洗浄したものと、10mM トリス緩衝液 (10mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) / 5 mM EDTA / 1% ドデシル硫酸ナトリウム) 4 mL に懸濁したものに、同量の n-ブタノール及びクロロフォルムを 4 対 1 (容量比) となる如く混合したものを添加して抽出し、常法により 3,000 r.p.m. で 10 分間遠心分離し、水層及び有機溶媒層に分離し、この有機溶媒層に上記 10mM トリス緩衝液 4 mL を添加し、上記抽出及び分離操作を行なう操作を 2 回繰り返して得られた水層に、1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) 及び 2 倍量の冷エタノールを添加したものを温度 -20°C で 2 時間放置したのち、常法により 8,000 r.p.m. で 20 分間遠心分離し、RNA を沈澱させ、得られた RNA を 4 mL の水に溶解し、上記エタノール沈澱操作を行なったのち、得られた RNA を 1 mL の水に溶解し、3.75 μg の RNA を得た。

そして、以上の操作を再度繰り返すことにより合計 7 mL の RNA を調製し、この RNA 中より m-RNA を選択するために、7 mL の RNA を、オリゴ(dT) - セルロース (ニューイングランドバイオラボ・社・製) カラムクロマトグラムにかけた。

カラムとして 2.5 mL テルモシリジング (テルモ・社・製) を用い、樹脂 0.5 g は、溶出緩衝液 (10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.6) / 1 mM EDTA / 0.1% (W/V) ドデシル硫酸ナトリウム) で膨潤させたのち、カラムに充填し、結合緩衝液 [10mM トリス-塩酸 (pH 7.6) / 1 mM EDTA / 0.4 M NaCl / 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム] で平衡化したものである。

7 mL の RNA に、同量の緩衝液 (10mM トリス-塩酸 (pH 7.6) / 1 mM EDTA / 0.8 M NaCl / 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム) を添加し、温度 65°C で 10 分間加熱処理し、氷中で急冷したのち、オリゴ(dT) - セルロースカラムにかけたのち、結合緩衝液で樹脂を洗净し、未結合の r-RNA 及び

t-RNA を完全に洗净し、更に、溶出緩衝液で m-RNA を溶出し、40 μg の m-RNA を得た。

2. ルシフェラーゼ m-RNA の濃縮

次に、ショ糖密度勾配遠心分離法によりルシフェラーゼ m-RNA を濃縮した。

10~25% (W/V) のショ糖密度勾配は、ベックマン・社・製のローター SW41 用ポリアロマチューブに 40% (W/V) ショ糖液 (50 mM トリス-塩酸 (pH 7.5) / 20 mM NaCl / 1 mM EDTA / 40% (W/V) ショ糖) 0.5 mL を入れ、その上に 2.4 mL ずつ 25% (W/V)、20% (W/V)、15% (W/V) 及び 10% (W/V) のショ糖液を重層し、温度 4°C で 24 時間放置することにより作製した。このショ糖密度勾配に、m-RNA 30 μg を重層し、ベックマン・社・製の SW41 ローターを用い、常法により 30,000 r.p.m.、温度 18°C で 18 時間遠心分離を行なった。遠心分離操作ののち、0.5 mL ずつ分画し、エタノール沈澱法により m-RNA を回収し、10 μL の水に溶解した。

次に、m-RNA にコードされている蛋白質を

調べることにより、ルシフェラーゼのm-RNAが濃縮されている画分の同定を行なった。分画したRNA 1 μl、ウサギ網状赤血球ライセート（アマシャム・社・製）9 μl及び(³⁵S)メチオニン 1 μl（アマシャム・社・製）を混合し、温度30℃で30分間反応させたものに、150 μlのNET緩衝液(150mM NaCl / 5mMEDTA / 0.02% (W/V) NaN₃ / 20mMトリス-塩酸緩衝液(pH 7.4) / 0.05% (W/V) ノニデットP-40(ベセスグリサーチラボラトリー・社・製、界面活性剤)）を添加し、更に、1 μlの抗ルシフェラーゼ血清（後述のようにして調製したもの。）を添加し、温度4℃で18時間放置したものに、10μlのプロティンAセファロース（ファルマシア・社・製）を添加し、温度20℃で30分間放置したものを、常法により12,000r.p.m.で1分間遠心分離処理し、樹脂を回収した。

回収した樹脂を、200 μlのNET緩衝液で3回洗浄し、この樹脂に、40 μlのSDS-PAGE用サンプル緩衝液(62.5mMトリス-塩酸緩衝液

(pH 6.8) / 10% (V/V) グリセロール / 2% (W/V) ドデシル硫酸ナトリウム / 5% (V/V) メルカブトエタノール / 0.02% (W/V) ブロムフェノールブルー）を添加し、温度100℃で3分間煮沸し、常法により12,000r.p.m.で1分間遠心分離処理し、上清を回収し、全量を7.5% (W/V) ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲルに乗せた。

ゲル電気泳動は、ラエムリ(Laemmli)の方法（ネーチュア(Nature)、第227頁、第680頁(1970)）で行ない、泳動したのちのゲルは、10% (V/V) の酢酸に30分間没漬し、蛋白質を固定したのち、水に30分間没漬し、更に、1Mサリチル酸ナトリウム溶液に30分間没漬し、乾燥して乾燥ゲルを得、X線フィルム(フジ写真フィルム・社・製、RX)を用いてフルオログラフィーを行なった。

以上の操作により、ルシフェラーゼm-RNAの存在する画分のRNAを用いた場合にのみ、ルシフェラーゼ蛋白質のバンドがX線フィルム上に認められ、ルシフェラーゼm-RNAの濃縮されている画分が同定できた。

3. 抗血清の調製

精製ルシフェラーゼに対するウサギの抗ルシフェラーゼ血清は、以下の方法により調製した。

3.2 mg/ml濃度のルシフェラーゼ溶液（シグマ・社・製ルシフェラーゼを0.5 Mグリシルグリシン溶液(pH 7.8)に溶解したもの）0.7 mlを、等量のフレンド(Freund)完全アジェバントで懸濁したもの2.24mgを、抗原として体重2kgの日本白色種ウサギの指掌部に投与し、飼育2週間経過したのち、初回と同量の抗原を背部皮内へ投与し、更に、飼育1週間経過したのち、同様の操作を行ない、また更に、飼育1週間後全採血を行なった。

そして、得られた血液を、温度4℃で18時間放置したものを、常法により3,000r.p.m.で15分間遠心分離し、上清として抗ルシフェラーゼ血清を得た。

4. c-DNAの合成

c-DNAの合成は、アマシャム・社・製キットを用いて行なったものである。

上述の如くして得られたm-RNA 2 μgを用

いてアマシャム社の指示するモル・セル・バイオル・(Mol. Cell Biol.)、第2巻、第161頁(1982)及びジーン(Gene)、第25巻、第263頁(1983)記載の方法に従い行なった結果、300ngの2本鎖c-DNAが得られた。

このc-DNA 150ngを、7 μlのTE緩衝液(10mMトリス-塩酸緩衝液(pH 7.5) / 1mMEDTA)に溶解したものに、11 μlの混液(280mMカコジル酸ナトリウム(pH 6.8) / 60mMトリス-塩酸緩衝液(pH 6.8) / 2mM塩化コバルト)及び3.8 μlのティリング混液(10mMジチオスレイトール7.5 μl / 10ng/mlボリ(poly) A 1 μl / 5mM dCTP 2 μl / 水110 μl)を夫々添加し、更に、29ユニットのターミナルトランスクレーバー(ベーリンガー・マンハイム・社・製)を添加し、温度30℃で10分間反応させたのち、2.4 μlの0.25M EDTA及び2.4 μlの10% (W/V) ドデシル硫酸ナトリウムを夫々添加して反応を停止させた。

反応停止液に25 μlの水飽和フェノールを用いて除蛋白処理を行なったのち、回収した水層に、

25 μ l の 4 M 酢酸アンモニウム及び 100 μ l の冷エタノールを夫々添加し、温度 -70°C で 15 分間放置し、12,000r.p.m. で 10 分間遠心分離して c-DNA を回収し、10 μ l の TE 緩衝液に溶解し、c-DNA 溶液を得た。

以上の如くしてデオキシシチジンのテイルの付いた c-DNA 100ngを得た。

5. ベクターに使用する組み換え体プラスミド pMCE10DNA の調製

プラスミド pMCE1403-3DNA (特開昭61-274683 号公報記載)、大腸菌 W3110 株 (ATCC27325)、プラスミド pBR325 (BRL・社・製) 及びプラスミド pBR322 DNA (宝酒造・社・製) を用いてティー・マスダ等 (T.Masuda et.al.) アグリカルチュラル・バイオロジカル・ケミストリー (Agricultural Biological Chemistry)、第50巻、第271 ~ 279 頁 (1986) 記載の方法を用いて作製したプラスミド pKN305 DNA 夫々 1 μ g を、10 μ l の混液 (50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) / 10mM MgCl₂ / 100mM NaCl / 1 mM ジチオスレ

イトル) に添加し、更に、これに、Hind III 及び Sal I (いずれも宝酒造・社・製、以下、同社製のものを使用) を夫々 2 ユニットずつ添加し、温度 37°C で 1 時間反応させて切断処理し、常法によるフェノール抽出及びエタノール沈澱処理を行ない沈澱物を得た。この沈澱物を、10 μ l のライゲーション緩衝液 (20mM MgCl₂ / 66mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.6) / 1 mM ATP / 15mM ジチオスレイトール) に溶解し、溶液を得、更に、1 ユニットの T4 DNA リガーゼ (宝酒造・社・製、以下同社製のものを使用) を添加し、温度 20°C で 4 時間連結反応を行なった。次いで、この反応液を用い、ジェイ・バクテリオロジー (J.Bacteriology、第119巻、第1072頁～第1074頁 (1974年)) 記載の形質転換法により、大腸菌 JM101 (ATCC33876) 株を形質転換し、薬剤耐性 (アンビシリン耐性及びテトラサイクリン感受性) 及び β -ガラクトシダーゼ活性を検討し、形質転換株を得、その株の含有する組み換え体プラスミド DNA を pMCE10 と命名した。この組み換え体プラスミド p

MCE10DNA を含有する大腸菌 JM101 株を、トリプトン 1% (W/V)、酵母エキス 0.5% (W/V)、及び NaCl 0.5% (W/V) からなる培地 1 l に、該培地を用い温度 37°C で 16~24 時間前培養して得た大腸菌 JM101 (pMCE10) の培養液 20 ml を接種し、温度 37°C で 3 時間振盪培養したのち、0.2g のクロラムフェニコールを添加し、更に同一温度で 20 時間同培養を行ない、培養液を得た。

次いで、この培養液を、常法により 1,000r.p.m. で 10 分間遠心分離して湿潤固体 2 g 得、これを 20 ml の 25% (W/V) ショ糖を含有する 350mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) に懸濁したのち、更に、これに、リゾチーム 10 mg、0.25M EDTA 溶液 (pH 8.0) 8 ml 及び 20% (W/V) ドデシル硫酸ナトリウム溶液 8 ml を夫々添加し、温度 60°C で 30 分間保温して溶菌し、溶菌液を得た。

この溶菌液に、5M NaCl 溶液 13 ml を添加し、温度 4°C で 16 時間処理したものを常法により 15,000 r.p.m. で 30 分間遠心分離して抽出液を得、常法によりフェノール抽出処理及びエタノール沈澱処理

を行ない沈澱物を得た。

次いで、この沈澱物を、通常の減圧乾燥処理したものと、1 mM EDTA を含有する 10mM トリス-塩酸緩衝液 6 ml (pH 7.5) に溶解し、更に、これに、塩化セシウム 6 g 及びエチジウムプロマイド溶液 (10mg/ml) 0.2 ml を添加したものを、常法により 39,000r.p.m. で 42 時間超遠心分離機を用いて平衡密度勾配遠心処理を行ない、組み換え体プラスミド pMCE10DNA を単離し、また更に、n-ブタノールを使用してエチジウムプロマイドを除去したのち、1 mM EDTA を含有する 10mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) に対して透析を行ない純化された組み換え体プラスミド pMCE10DNA 500 μ g を得た。

6. ベクター-DNA の調製

以上の様にして得られた組み換え体プラスミド pMCE10DNA 15 μ g を、90 μ l の前記 TE 緩衝液に溶解し、10 μ l の Med 缓衝液 (10mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) / 10mM MgCl₂ / 1 mM ジチオスレイトール / 50mM NaCl) を添加したのち 30 ユ

ニットの制限酵素 Acc I (宝酒造・社・製) を更に加え、温度37℃で1時間切断処理を行ない切断処理物を得た。この切断処理物に、100μLの水飽和フェノールを加え除蛋白操作を行なったのち、水層を回収し、これに、1/10量の3M酢酸ナトリウム(pH7.5)及び2倍量の冷エタノールを加え、温度-70℃で15分間放置したのち、12,000r.p.m.で10分間遠心分離し、DNAを回収した。

このDNAを、10μLのTE緩衝液に溶かし、15μLの混液(280mMカコジル酸ナトリウム(pH6.8)/60mMトリス-塩酸緩衝液(pH6.8)/2mM塩化コバルト)を加えたのち、更に、5μLのティリング混液(項目4記載)(5mM dGTPを用いた)を加え、また更に、5ユニットのターミナルトランスクレーバー(宝酒造・社・製)を添加し、温度37℃で15分間反応させた。項目4記載のc-DNAティリング反応と同様の後処理を行なうことにより組み換え体プラスミドpMCE10DNAのAcc Iサイトにデオキシグアノシンのテイルが付いたDNAを調製した。

合成したc-DNA 15ng及びベクター-DNA 200ngを、35μLのアニール緩衝液(10mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)/100mM NaCl/1mMEDTA)に溶解し、温度65℃で2分間、温度46℃で2時間、温度37℃で1時間及び温度20℃で18時間放置する操作によりc-DNAとベクター-DNAをアニールした。

アニールしたDNAを用いて、ハナハン(Hanahan)の方法(ディーエヌエイクローニング(DNA Cloning)、第1巻、第109~135頁(1985))により大腸菌DH1株(ATCC33849)を形質転換し、プラスミドpUC19DNA及び組み換え体プラスミドpMCE10DNAをベクターとしたc-DNAバンクを作製した。

8. ルシフェラーゼc-DNAの検索

組み換え体プラスミドpMCE10DNAのAcc I部位は、大腸菌β-ガラクトシダーゼ遺伝子をコードする部位にあるので、この部位に組み込まれたc-DNAはβ-ガラクトシダーゼとの融合蛋白質を作る。また組み換え体プラスミドpMC

一方、プラスミドpUC19DNAのPst Iサイトにデオキシグアノシンのテイルが付いたDNAの調製も同時に実行なった。

プラスミドpUC19DNA(宝酒造・社・製)30μgを、350μLのTE緩衝液に溶解したものに、40μLのMed緩衝液及び制限酵素Pst I(宝酒造・社・製)120ユニットを夫々添加し、温度37℃で1時間切断処理したのち、常法によりフェノールによる除蛋白処理及びエタノール沈澱処理によりDNAを回収した。

得られたDNAを、35μLのTE緩衝液に溶解したものに、50μLの混液(280mMカコジル酸(pH6.8)/60mMトリス-塩酸緩衝液(pH6.8)/1mM塩化コバルト)、19μLの項目4記載のティリング混液(dGTP含有)並びに60ユニットのターミナルトランスクレーバー(宝酒造・社・製)を夫々添加し、温度37℃で10分間反応させたのち、常法によりフェノール処理及びエタノール沈澱を行なうことによりDNAを回収した。

7. アニーリング及び形質転換

E10のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子のプロモーターは前述した様に大腸菌トリプトファン遺伝子のプロモーターに変換してある。

組み換え体プラスミドpMCE10DNAを、ベクターとするc-DNAバンクのコロニー96個を10mLのM9カゼミノ酸培地(モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)、第440~441頁、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory)(1982))にチアミン(10μg/mL)を加えた培地を用い温度37℃で10時間振盪培養し、常法により集菌したのち、200μLのS DS-PAGE用サンプル緩衝液に懸濁し、温度100℃で5分間煮沸した。

この懸濁液40μLを、7.5%(W/V)ポリアクリルアミドゲルを用いて、常法により電気泳動を行なった。泳動終了後、ゲルに展開した蛋白質を、ウエスタンプロット法(Anal. Biochem.)、第112巻、第195頁(1981))によりニトロセルロースのフィルターに転写し、このニトロセルロースフィルターをイミューンブロ

ットアッセイキット（バイオラッド・社・製）を用いて抗ルシフェラーゼ血清で染色した。方法は、バイオラッド社の操作法に従った。

即ちニトロセルロースのフィルターを、100μlのプロッキング溶液〔TBS緩衝液(20mMトリス-塩酸緩衝液1500mM NaCl(pH7.5))に3%(W/V)のゼラチンを溶かした溶液〕中温度25℃で、30分間振盪した。次に、このニトロセルロースフィルターを25μlの一次抗体溶液〔ルシフェラーゼ抗血清を1%(W/V)のゼラチンをTBS緩衝液に溶かした溶液で25倍(V/V)に希釈した溶液〕に移し、温度25℃で90分間振盪したものを、100μlのツイーン(Tween)-20洗液(TBS緩衝液に0.05%(W/V)のツイーン(Tween)-20を溶かした溶液)中に移し、温度25℃で10分間振盪する操作を2回行なった。次いで、このようにして得たニトロセルロースフィルターを60μlの二次抗体溶液〔西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した抗ウサギ抗体(バイオ・ラッド社製)を1%(W/V)のゼラチンをTBS緩衝液に溶かした溶液で3000倍(V/V)に

希釈した溶液〕中に移し、温度25℃で60分間振盪したのち、100μlのツイーン(Tween)-20洗液でニトロセルロースフィルターを洗う上記操作を2回繰り返し、このようにして得たニトロセルロースフィルターを、120μlの発色液〔60μlの4-クロロ-1-ナフトロールを20μlの冷メタノールに溶解した溶液及び60μlの30%(V/V)過酸化水素水を100μlのTBS緩衝液に添加した溶液を混合した溶液〕中に移し、温度25度で10分間発色させた。

この様にして96個のコロニーを1グループとして4グループについて同様の方法を行なったところ、2つのグループでルシフェラーゼ抗血清で染まる蛋白質バンドが認められた。次に、この2つのグループに属する96個のコロニーを12個のコロニーずつ8グループに分け同様の操作を行なったところ夫々1グループに抗ルシフェラーゼ血清と反応する蛋白質が認められた。最後に、このグループに含まれる12個のコロニーを、1個のコロニーずつ温度37℃で10時間振盪培養し、同様の操作

を行ないルシフェラーゼ抗血清と反応する蛋白質を作るコロニーを同定した。以上の操作によりルシフェラーゼc-DNAをもつ2個のコロニーが得られた。この2個のコロニーより項目5記載の方法でプラスミドDNAを調製した。得られた組み換え体プラスミドDNAは、pALf2B8及びpALf3A6と夫々命名した。

9. 大きなルシフェラーゼc-DNAの検索-DNAのプローブの作製

組み換え体プラスミドpALf3A6DNA100μgを、330μlのTE緩衝液に溶解し、これに40μlのLow緩衝液(10mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)/10mM MgCl₂/1mMジチオスレイトール)、130ユーニットのPstI(宝酒造・社・製)及び120ユーニットのSacI(ベーリンガー・マンハイム・社・製)を添加し、温度37℃で1.5時間切断した。

このDNA全量を0.7%(W/V)アガロースゲルを用いた電気泳動で分離した。アガロースゲル電気泳動はティー・マニアテス(T. Maniatis)等の方法〔モレキュラー・クローニング(Molecular Clon-

ing)、第156～161頁、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ(Cold Spring Harbor Laboratory)(1984)〕に従って行なった。ルシフェラーゼc-DNAを含むDNAバンドを切り出し、透析チューブに入れ、2μlのTE緩衝液を加えたのち、透析チューブをシールし、電気泳動により、ゲル中より緩衝液中にDNAを溶出した。この溶液に等容量の水飽和フェノールを加え、攪拌したのち、水層を回収し、常法に従いエタノール沈澱によりDNAを回収した。

得られたDNAフラグメント10μgを、126μlのTE緩衝液に溶かし、16μlのMseI緩衝液及び64ユーニットのScaI(宝酒造・社・製)を加え、温度37℃で2時間反応させたのち、全量を5%(W/V)ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動により、DNA断片の分離を行なった。ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、エイ・マクサム(A. Maxam)の方法〔メソズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology)、第65巻、第506頁(1980)〕に従って行なった。190bpのDNAフラグメントを前

述と同様の方法で単離し、 $1\ \mu\text{g}$ の Sau 3 A I ルシフェラーゼ c - DNA フラグメントが得られた。この $1\ \mu\text{g}$ のルシフェラーゼ c - DNA を、(α - ^{32}P) dCTP (アマシャム・社・製) を用いてニックトランスレーション法により標識した。ニックトランスレーションは宝酒造社製のキットを用い、宝酒造社の指示するジェイ・モル・バイオル (J. Mol. Biol.)、第113巻、第237 ~ 251頁 (1977) 及びモレキュラー・クローニング (Molecular Cloning)、第109 ~ 112頁、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ (Cold Spring Harbor Laboratory) (1982) 記載の方法に従って行なった。

10. 大きなルシフェラーゼ c - DNA の検索 - コロニーハイブリダイゼーション

前述の方法で調製した ^{32}P で標識したルシフェラーゼ c - DNA 断片を、プローブとして用い、組み換え体プラスミド pUC19DNA をベクターとするフォティナス・ビラリス尾部 c - DNA パンクを、コロニーハイブリダイゼーション法 (蛋白

白質・核酸・酵素、第26巻、第575~579頁 (1981) で検索し、ルシフェラーゼ c - DNA を有するコロニーを得た。そのうちの1個のコロニーの有する組み換え体プラスミド DNA を pAL f 3 と命名し、項目5記載の方法でプラスミド DNA を調製した。

そして、上記組み換え体プラスミド pAL f 3 DNA を、Xba I、Hind III、Bam HI、Eco RI 及び Pst I (いずれも宝酒造・社・製) を用い、單一消化及び2重消化して得られた DNA 断片をアガロースゲル電気泳動法により移動度パターンを分析し、得られた移動度パターンと λ DNA (宝酒造・社・製) を Hind III により消化して得られた DNA 断片の標準移動度パターンと対比することにより得られた分子量は、1,700bp であり、上記プラスミドの制限酵素地図は、第1図に示すとおりであった。

11. 組み換え体プラスミド pAL f 201 DNA の構築

組み換え体プラスミド pAL f 3 DNA 3.8 μg

を、 $87\ \mu\text{l}$ の TE 緩衝液に溶かしたものに、 $10\ \mu\text{l}$ の High緩衝液 (10mMトリス-塩酸緩衝液 (pH7.5) / 10mM MgCl₂ / 1mMジチオスレイトール / 100mM NaCl)、45ユニットの Bam HI 及び65ユニットの Xba I (いずれも宝酒造・社・製) を添加し、温度37°Cで2時間反応させたのち、フェノールによる除蛋白操作を行ない、更に、エタノールにより沈澱操作を行ない、DNA 沈澱を得た。

一方、2種の合成オリゴヌクレオチドである 5' GATCCAAGCTTATG 3' 及び 5' CTAGCATAAGCTTG 3' をベックマン社製 DNA 合成機を用いて合成した。Xba I 及び Bam HI で切断した組み換え体プラスミド pAL f 3 DNA 0.3 μg 、上記2種の合成オリゴヌクレオチド各 $1\ \mu\text{g}$ 及び T4 DNA リガーゼ1ユニット (ベーリングガー・マンハイム・社・製) を、 $10\ \mu\text{l}$ の混液 (66mMトリス-塩酸緩衝液 (pH7.6) / 1mM ATP / 1mMスベルミジン / 10mM MgCl₂ / 15mMジチオスレイトール / 0.2 mM (牛血清アルブミン) 中で温度4°Cで18時間反応させ、DNA の結合を行なった。

得られたDNAを用いて形質転換法 (前述のコーエン等の方法) により、大腸菌 HB101 株 (ATCC33694) を形質転換した。得られた組み換え体プラスミドは、pAL f 101 と命名し、前述の方法で組み換え体プラスミド DNA を調製した。

組み換え体プラスミド pAL f 101 DNA 2 μg を、 $85\ \mu\text{l}$ の TE 緩衝液に溶かし、 $10\ \mu\text{l}$ の Med 缓衝液及び50ユニットの Hind III (宝酒造・社・製) を添加し、温度37°Cで2時間切断した。得られた切断物を、0.7% (W/V) アガロースゲル電気泳動により分離し、1.7 Kb のフラグメントを前述の方法を用いてゲルより溶出して溶出物を得、フェノール抽出及びエタノール沈澱処理して DNA 断片 0.4 μg を得た。

次に、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ由来のプロモーターベクター AAH 5 DNA (ワシントン・リサーチ・ファウンデーションより入手) 2 μg を、 $18\ \mu\text{l}$ の TE 緩衝液に溶かし、 $2\ \mu\text{l}$ の Med 缓衝液及び10ユニットの Hind III (宝酒造・社・製) を添加し、温度37°Cで1時間切断したの

特開昭63-317079(10)

ち、常法に従ってフェノール抽出及びエタノール沈殿処理してDNAを沈殿させた。

Hind III切断プラスミドAAH5 DNA 75ng、組み換え体プラスミドpAL f 101 DNA由来の1.7 Kb DNA断片40ng及びT4 DNAリガーゼ0.5ユーニット(ベーリングガー・マンハイム・社・製)を10μlの混液(65mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.4)/13mM MgCl₂/65mMジオオスレイトール/1.3 mM ATP)中に添加し、連結反応を行なったのち、前述のコーエン等の形質転換法により大腸菌HB101(ATCC33694)株を形質転換し、アンビシリントリプトニン耐性となつた形質転換株を選択した。得られたアンビシリントリプトニン耐性形質転換株を1%(W/V)トリプトン/0.5%(W/V)酵母エスキ/0.5%(W/V)NaCl培地3mL中温度37℃で18時間振盪培養したのち、ティー・マニアテス(T. Maniatis)等の方法(モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)、第366~367頁、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ(Cold Spring Harbor Laboratory)(1984))により少量の組み換え体ブ

ラスミドDNAを調製し、Hind III(宝酒造・社・製)による単独切断DNAパターン及びBamH I, EcoRI(ともに宝酒造・社・製)の二重切断DNAパターンをアガロースゲル電気泳動法を用いて分析した。以上の分析によりアルコールデヒドロゲナーゼプロモーターの下流に正しくルシフェラーゼc-DNAが組み込まれた組み換え体プラスミドDNAを選択した。

プラスミドAAH5 DNAのアルコールデヒドロゲナーゼプロモーターに対して順方向にルシフェラーゼc-DNAが組み込まれた組み換え体プラスミドDNAをpAL f 201と命名し、前述の方法により組み換え体プラスミドpAL f 201 DNAを調製した。

12. 組み換え体プラスミドpAL f 201 DNAによる酵母の形質転換

組み換え体プラスミドpAL f 201 DNAを用い、サッカロマイセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae) SHY1株(ATCC44769)を、ベッグス(Beggs)の方法(ネイチャー(Nature)、

第275巻、第104頁(1978))により形質転換し、形質転換株、サッカロマイセス・セレビシエSHY1(pAL f 201)を得た。

13. 形質転換株、サッカロマイセス・セレビシエSHY1(pAL f 201)によるルシフェラーゼの生産

形質転換株、サッカロマイセス・セレビシエSHY1(pAL f 201)を、YPD培地(グルコース20g/L、ポリペプトン20g/L及び酵母エキス10g/L)3mLに接種し、温度30℃で、6時間振盪培養し、得られた培養菌体を、ルシフェラーゼアッセイ用緩衝液(0.1M KH₂PO₄(pH7.8)/2mM EDTA/1mMジオオスレイトール/0.2mg/mLブロクミン・サルフェート)0.3mLに懸濁し、懸濁液を得、これに、ガラスピーブを懸濁液の1/2量となる如く添加し、ミキサー(サイエンティフィック・イングストリー・社・製)を用いて3分間破碎処理を行なつたのち、1,200r.p.m.で5分間遠心分離し、上清として粗酵素液0.2mLを得た。

このようにして得られた粗酵素液中のルシフェ

ラーゼ活性の測定は、クリッカ(Kricker)等の方法(アチーブス・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィзиクス(Archives of Biochemistry and Biophysics)、第217巻、第674頁(1982))に従つて生成するフォトン数を計測することにより行なつた。

すなわち、260μLの25mMグリシルグリシン緩衝液(pH7.8)、16μLの0.1M硫酸マグネシウム、24μLの1mMルシフェリン(シグマ・社・製)及び10μLの粗酵素液を混合したのち、100μLの20mM ATPを添加し、発生するフォトン数を20秒間積算した値を下表に示した。

なお、比較のため、発現用プラスミドAAH5 DNAベクターを有する酵母サッカロマイセス・セレビシエSHY1株(ATCC44769)を用いる以外は上記と同様に計測した値を下表に示した。

(本頁以下余白)

表

試 料	項 目	フォトン数／ml 培養液
ラクロマイセス・セレビシSHY1 (pALf201) (本発明)		1.2×10^5
ラクロマイセス・セレビシSHY1 (AAH5) (対照)		5.3×10^3

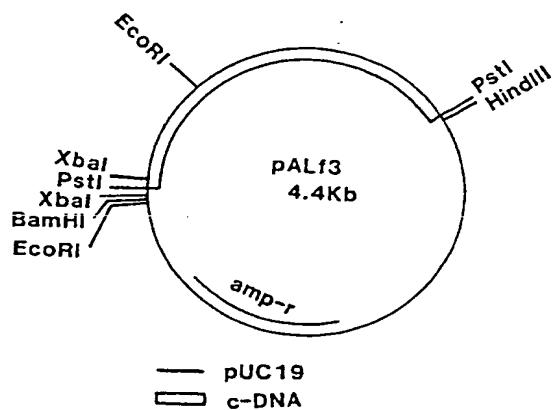
上表より明らかな如く、本発明は、対照に比し、フォトン数が増加しているため、本発明の酵母菌体中にルシフェラーゼが生産されていることが判明した。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、組み換え体プラスミド pALf3-DNA の制限酵素による切断地図を示す図である。

特許出願人 キッコーマン株式会社
代理人 弁理士 平木祐輔

第1図



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.